

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁴ : C12N 15/00, C12P 21/00	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 89/ 02461 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 23. März 1989 (23.03.89)
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE88/00535</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 29. August 1988 (29.08.88)</p> <p>(31) Prioritätsaktenzeichen: P 37 31 874.8</p> <p>(32) Prioritätsdatum: 18. September 1987 (18.09.87)</p> <p>(33) Prioritätsland: DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; Müllerstr. 170/178, D-1000 Berlin 65 (DE).</p> <p>(72) Erfinder;und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US) : SCHEIDECKER, Harald [DE/DE]; Haydnstr. 26, D-1000 Berlin 41 (DE). DAUM, Joachim [DE/DE]; Kyllmannstr. 22d, D-1000 Berlin 45 (DE). DONNER, Peter [DE/DE]; Steglitzer Damm 7a, D-1000 Berlin 41 (DE). SIEWERT, Gerhard [DE/DE]; Nibelungenstr. 39, D-1000 Berlin 28 (DE).</p>	<p>(81) Bestimmungsstaaten: AT (europäisches Patent), BE (europäisches Patent), CH (europäisches Patent), DE (europäisches Patent), FR (europäisches Patent), GB (europäisches Patent), IT (europäisches Patent), JP, LU (europäisches Patent), NL (europäisches Patent), SE (europäisches Patent), US.</p> <p>Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i></p>	
<p>(54) Title: PROCESS FOR PRODUCING PEPTIDES BY SPECIFIC CLEAVAGE OF FUSION PROTEINS WITH COLLAGENASES OBTAINED BY GENETIC ENGINEERING</p> <p>(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON PEPTIDEN DURCH SPEZIFISCHE SPALTUNG VON GENTECHNISCH GEWONNENEN FUSIONSPROTEINEN MIT COLLAGENASEN</p> <p>(57) Abstract</p> <p>Fusion proteins are disclosed having the formula (I) $H_2N-Z_1-X-(Pro-Y-Gly)_n-Pro-Z_2-COOH$, in which $n \geq 2$, X and Y are each of the 20 amino-acids determined by the genetic code, Z_1 is a bacterial amino-acid sequence and Z_2 is the target peptide composed of any desired amino-acids of the genetic code. Also disclosed are their production process and their enzymatic cleavage to form desired eukaryotic proteins.</p> <p>(57) Zusammenfassung</p> <p>Die vorliegende Erfindung betrifft Fusionsproteine der Formel (I): $H_2N-Z_1-X-(Pro-Y-Gly)_n-Pro-Z_2-COOH$ in der $n \geq 2$ ist, X und Y jede der 20 durch den genetischen Code festgelegten Aminosäuren darstellt, Z_1 eine bakterielle Aminosäuresequenz und Z_2 das Zielpolypeptid aus beliebigen Aminosäuren des genetischen Codes bedeuten, Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre enzymatische Spaltung zu gewünschten eukaryotischen Proteinen.</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT Österreich	FR Frankreich	MR Mauritien
AU Australien	GA Gabun	MW Malawi
BB Barbados	GB Vereinigtes Königreich	NL Niederlande
BE Belgien	HU Ungarn	NO Norwegen
BG Bulgarien	IT Italien	RO Rumänien
BJ Benin	JP Japan	SD Sudan
BR Brasilien	KP Demokratische Volksrepublik Korea	SE Schweden
CF Zentrale Afrikanische Republik	KR Republik Korea	SN Senegal
CG Kongo	LI Liechtenstein	SU Soviet Union
CH Schweiz	LK Sri Lanka	TD Tschad
CM Kamerun	LU Luxemburg	TG Togo
DE Deutschland, Bundesrepublik	MC Monaco	US Vereinigte Staaten von Amerika
DK Dänemark	MG Madagaskar	
FI Finnland	ML Mali	

Verfahren zur Herstellung von Peptiden durch spezifische Spaltung von gentechnisch gewonnenen Fusionsproteinen mit Collagenasen

Die Gentechnologie hat neue Wege zur Herstellung von Peptiden und Proteinen eröffnet, welche der herkömmlichen chemischen Synthese, insbesondere bei längeren Aminosäuresequenzen, weit überlegen sind. Dadurch stehen erstmals sonst schwer zugängliche Substanzen wie Wachstumshormon, Interferone und zahlreiche Peptidhormone in ausreichenden Mengen zur Verfügung (F.A.O. Marston, Biochem. J. 240, 1-12 [1986]).

Die gentechnischen Verfahren zur Herstellung von Polypeptiden beruhen auf der Übertragung einer geeigneten Desoxyribonukleinsäure (DNA), welche Codons für die herzustellende Aminosäuresequenz enthält, auf geeignete Wirtszellen in einer Form, welche

die Replikation und die Expression der neu eingebrachten genetischen Information ermöglicht. Als Wirtszellen werden bei kleinen bis mittelgroßen Peptiden (weniger als ca. 100 Aminosäuren) vorzugsweise Bakterien wie *Escherichia coli* eingesetzt.

Es hat sich nun gezeigt, daß Polypeptide des genannten Größenbereiches sehr leicht von intrazellulären bakteriellen Proteasen angegriffen werden, da sie nicht durch eine ausgeprägte Tertiärstruktur geschützt sind. Dies kann zu einer starken Ausbeuteverminderung oder auch zum völligen Verlust des primären Biosyntheseproduktes führen, wenn die Expression so gelenkt wird, daß das herzustellende Polypeptid direkt in der endgültigen Form oder allenfalls mit einem zusätzlichen N-terminalen Methionin-Rest gebildet wird (sogenannte direkte Expression). Dagegen lassen sich die gewünschten Aminosäuresequenzen in der Regel in guter Ausbeute erhalten, wenn sie zunächst als sehr viel größere Vorläufermoleküle, sogenannte Fusionsproteine, synthetisiert werden.

Zur Herstellung kleinerer und mittelgroßer Peptide wird daher eine Verfahrensvariante bevorzugt, bei welcher durch In Vitro-Neukombination aus einem gut exprimierbaren und möglichst auch regulierbaren bakteriellen Gen und der DNA-Sequenz für das herzustellende Peptid ein Hybrid-Gen auf einem Plasmid-Vektor gebildet wird. Das Hybrid-Gen enthält die ursprünglichen bakteriellen Regulationselemente (Promotor, ribosomale Bindungsstelle und Terminator) sowie einen möglichst großen Teil der Codons für die N-terminalen Aminosäuren des bakteriellen Genproduktes,

gefolgt von den Codons für das neue Peptid sowie einem Stopcodon. Nach Überführung des Plasmid-Vektors in eine geeignete bakterielle Wirtszelle durch Transformation steuert das Hybrid-Gen die Biosynthese eines Fusionsproteins, dessen N-terminaler Teil sich von dem entsprechenden bakteriellen Protein ableitet, während der C-terminale Teil aus der Aminosäuresequenz des herzustellenden Peptids besteht. Dieses Fusionsprotein kann leicht durch Fermentation der transformierten Zellen in großen Mengen hergestellt und isoliert werden. Verschiedene bakterielle Gene sind für die Konstruktion von Hybrid-Genen eingesetzt worden, vorzugsweise jedoch solche für die Enzyme β -Galactosidase, β -Lactamase, Anthranilat-Synthetase, alkalische Phosphatase und Chloramphenicol-Acetyltransferase.

Die letzte Stufe bei der Herstellung eines Peptids nach dem oben skizzierten Verfahren ist die exakte Spaltung des Fusionsproteins. Um diese zu ermöglichen, muß das Hybrid-Gen so konstruiert werden, daß in dem späteren Fusionsprotein zwischen dem bakteriellen Teil und der neu herzustellenden Peptidsequenz eine leicht und selektiv spaltbare Peptidbindung vorhanden ist. Die Entwicklung eines spezifischen und möglichst breit anwendbaren Verfahrens für die Spaltung von Fusionsproteinen hat sich als das größte und bisher nicht völlig zufriedenstellend gelöste Problem bei der gentechnischen Herstellung kleinerer und mittelgroßer Peptide erwiesen.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein spezifisches und daher allgemein anwendbares Verfahren zur Spaltung von Fu-

sionsproteinen, welches die exakte Aminosäuresequenz des gewünschten Peptids liefert, ohne am N-terminalen Ende unerwünschte zusätzliche Aminosäuren zu hinterlassen.

Die ersten gentechnisch hergestellten Peptide, wie z.B. Somatostatin (K. Itakura et al., Science 198, 1056-1063 [1977]) oder die A- und B-Ketten von humanem Insulin (D.V. Goeddel et al., Proc. Natl. Acad. Sci, USA 76, 106-110 [1979]), waren durch Spaltung mit Bromcyan aus den entsprechenden Fusionsproteinen, welche sich von β -Galactosidase ableiteten, freigesetzt worden. Bromcyan spaltet selektiv die Bindung zwischen Methionin und der nächsten carboxylständigen Aminosäure (Met-X, wobei X irgendeine der 20 durch den genetischen Code festgelegten Aminosäuren sein kann). Dieses Verfahren ist naturgemäß nur anwendbar für Peptide, welche selbst kein Methionin enthalten; das trifft für die drei oben genannten Peptide zu.

Gleichartige Einschränkungen gelten für alle Verfahren zur Spaltung von Fusionsproteinen, welche auf der Erkennung einer einzelnen Aminosäure beruhen. So sind Fusionsproteine hergestellt worden, welche die Aminosäuren Lysin, Arginin oder Glutaminsäure als Verknüpfung zwischen dem N-terminalen und dem C-terminalen Teil enthalten. Zur Spaltung wurden die Enzyme Trypsin (J. Shine et al., Nature 285, 456-461 [1980]) und Clostripain (A.D. Bennett et al., EPA 0131363), welche beide die Bindung zwischen Lys-X und Arg-X öffnen sowie Endoproteinase Glu-C (A.D. Bennett et al., EPA 0131363), welche die Bindung Glu-X spaltet, verwendet. Endoproteinase Lys-C (G. Allen et al., Biol.

Chem. Hoppe-Seyler 367, Suppl. Aug. 1986, S. 162, Abstr.

19.01.03), die spezifisch nach Lysin spaltet, ist ebenfalls eingesetzt worden.

Sehr viel spezifischer und damit breiter anwendbar sind Verfahren, die eine spezifische Bindung innerhalb einer genau definierten Sequenz aus mehreren Aminosäuren spalten. So konnten P.R. Szoka et al. (DNA 5, 11-20 [1986]) ein Fusionsprotein, in dem eine Teilsequenz aus Anthranilat-Synthetase sowie Rinder-Wachstumshormon über die Sequenz Asp-Pro miteinander verknüpft sind, durch Einwirkung von Säure in die beiden Bestandteile zerlegen, weil die Bindung Asp-Pro sehr säurelabil ist. Neben der Tatsache, daß man bei der Einwirkung von Säure auch mit der Spaltung weiterer Peptidbindungen als Nebenreaktion rechnen muß, hat dieses Verfahren vor allen den Nachteil, daß das Prolin aus der Kopplungssequenz am N-terminalen Ende des Peptids übrig bleibt, was in vielen Fällen nicht tolerabel ist. Die gleiche Einschränkung muß man bei der Umsetzung mit Renin machen, welches verwendet worden ist, um in einem Fusionsprotein innerhalb der Sequenz Pro-Phe-His-Leu-Leu-Val-Tyr selektiv die Bindung zwischen den beiden Leucin-Resten zu spalten (J.S. Bonger et al., EPA 0163573.). In diesem Fall bleiben drei zusätzliche und häufig unerwünschte N-terminale Aminosäuren übrig.

Faktor Xa, eine Plasmaprotease, deren normale Funktion die Umwandlung von Prothrombin in Thrombin ist, ist von K. Nagai und H.C. Thøgersen (Nature 309, 810-812 [1984]) verwendet worden, um humanes β -Globin aus einem Fusionsprotein freizusetzen, des-

sen N-terminaler Teil aus 31 Aminosäuren des λ cII-Proteins bestand. In ähnlicher Weise haben T. Imai et al. (J. Biochem. 100, 425-432 [1986]) das Enzym eingesetzt, um humanes Prorenin über ein Fusionsprotein mit 9 zusätzlichen N-terminalen Aminosäuren herzustellen. In beiden Fällen war als Übergang zwischen N- und C-terminalem Bereich die Sequenz Ile-Glu-Gly-Arg-X vorhanden, die vom Faktor Xa spezifisch erkannt und an der Bindung zwischen Arg und X gespalten wird (wobei X die erste N-terminale Aminosäure des humanen Proteins ist). Faktor Xa scheint daher die Forderungen zu erfüllen, die man an ein Enzym stellen muß, welches für die Spaltung von Fusionsproteinen eingesetzt werden soll. Allerdings sind auch zwei Fälle berichtet worden, in denen eine Spaltung von Fusionsproteinen, welche die obige Erkennungssequenz enthielten, mit Faktor Xa nicht möglich war (G. Allen et al., Biol. Chem. Hoppe-Seyler 367, Suppl. Aug. 1986, S. 162, Abstr. 19.01.03; H. Mayer et al., Biol. Chem. Hoppe-Seyler 367, Suppl. Aug. 1986, S. 285, Abstr. 05.01.50). Eine generelle Anwendung dieses Verfahrens ist daher nicht möglich.

Ähnliche Einschränkungen muß man für das Enzym Enterokinase machen, welches in der Sequenz (Asp)₄-Lys-X die Bindung zwischen Lys und X spaltet. R.M. Belagaje et al. (DNA 3, 120 [1984]) haben zwar mit diesem Enzym menschliches Wachstumshormon aus einem Fusionsprotein freigesetzt, in welchem sich diese Sequenz nicht weit vom N-terminalen Ende entfernt befindet, ähnlich wie in

Trypsinogen, dem natürlichen Substrat der Enterokinase.

Versuche, Fusionsproteine, in denen alkalische Phosphatase und adrenocorticotropes Hormon über die genannte Sequenz verknüpft waren, mit Enterokinase zu spalten, waren jedoch nicht erfolgreich.

In EP 20290 wird ein Verfahren beschrieben, das die hohe Spezifität von Collagenasen zur Spaltung von Fusionsproteinen entsprechender Struktur ausnutzt.

Collagenasen erkennen die Sequenz Pro-Y-Gly-Pro, wobei Y jede beliebige der 20 Aminosäuren des genetischen Codes sein kann, und spalten zwischen Y und Gly. Aus einem Fusionsprotein, welches diese Sequenz enthält, wird ein Peptid freigesetzt, welches am N-terminalen Ende noch die aus der Collagenase-Sequenz stammenden Aminosäuren Gly und Pro enthält. Diese können als Dipeptid mit einem weiteren Enzym, der Postprolin-Dipeptidyl-Aminopeptidase (PPDA), entfernt werden.

Versuche zur Spaltung von Peptiden und Proteinen, welche die Sequenz Pro-Y-Gly-Pro enthalten, mit Clostridiopeptidase A, einer Collagenase aus Clostridium histolyticum (EC 3.4.24.3), haben nun gezeigt, daß die Anwendung der oben beschriebenen Reaktionsfolge zur Herstellung von Peptiden über Fusionsproteine nur in sehr begrenztem Maße möglich ist. Zwar konnten M. Töpert et al. (Mitteilung beim 14. FEBS-Meeting [1981]) zeigen, daß sich ein relativ kleines, halbsynthetisches Modellpeptid, und zwar die Verbindung

Cbo-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-Insulin-A-Kette (Rind)

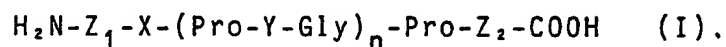
entsprechend dem oben dargestellten Schema mit Clostridiopeptidase A und PPDA umsetzen läßt, wobei die erwarteten Reaktionsprodukte in guter Ausbeute erhalten wurden. Ähnliche Ergebnisse erhielten E. Wunsch et al. (Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 362, 1285-1287 [1981]) bei der Umsetzung eines anderen Modellpeptids. Dagegen ließen sich von vier natürlichen Proteinen mit der Sequenz Pro-Y-Gly-Pro nur zwei (Neurophysin II und Rinderkatalase) mit Clostridiopeptidase A spezifisch spalten, und dies auch nur nach Umwandlung der Cystein-Seitenketten in die S-Sulfonate. Trotz eines relativ großen Enzymüberschusses konnte jedoch keine quantitative Umsetzung erreicht werden (M. Töpert et al., Mitteilung beim 14. FEBS-Meeting [1981]).

In der deutschen Patentanmeldung (Aktenzeichen P 37 31 875.6) wird ein Verfahren zur Herstellung von adrenocorticotropem Hormon über Fusionsproteine beschrieben, die sich von der alkalischen Phosphatase aus E.coli ableiten. Auch in diesem Fall wurde gefunden, daß Fusionsproteine mit einer Tetrapeptidsequenz Pro-Y-Gly-Pro zwischen bakterieller Proteinsequenz und Zielpeptid, wobei Y jede der 20 Aminosäuren des genetischen Codes bedeutet, sich zwar spezifisch an der vorbestimmten Stelle mit Clostridiopeptidase A spalten lassen, jedoch war die Reaktionsgeschwindigkeit sehr niedrig.

J. Germino und D. Bastia (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 4692-4696 [1984]) haben ein Fusionsprotein hergestellt, welches als Bindeglied zwischen dem N- und C-terminalen Bereich eine Sequenz aus ca. 60 Aminosäuren aus Pro α -2-Collagen enthielt. Die-

ses Protein ließ sich mit Collagenasen ähnlich gut spalten wie das entsprechende Collagen selbst. Es ist jedoch nicht bekannt, an welchen Stellen innerhalb der Sequenz von ungefähr 60 Aminosäuren das Fusionsprotein genau gespalten wird. Es zeigte sich außerdem, daß ein mehr oder weniger großer Rest dieser Sequenz noch am N-terminalen Ende des C-terminalen Spaltproduktes vorhanden ist. Daher ist diese Verfahrensvariante zur Herstellung von Polypeptiden mit genau vorgegebenem N-terminalen Ende ungeeignet.

Die vorliegende Erfindung besteht in einem Verfahren zur Herstellung von Zielpeptiden, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man aus einem Fusionsprotein der Formel I,



in der

$n \geq 2$ ist,

X und Y jede der 20 durch den genetischen Code festgelegten Aminosäuren darstellt,

Z_1 eine bakterielle Aminosäuresequenz und

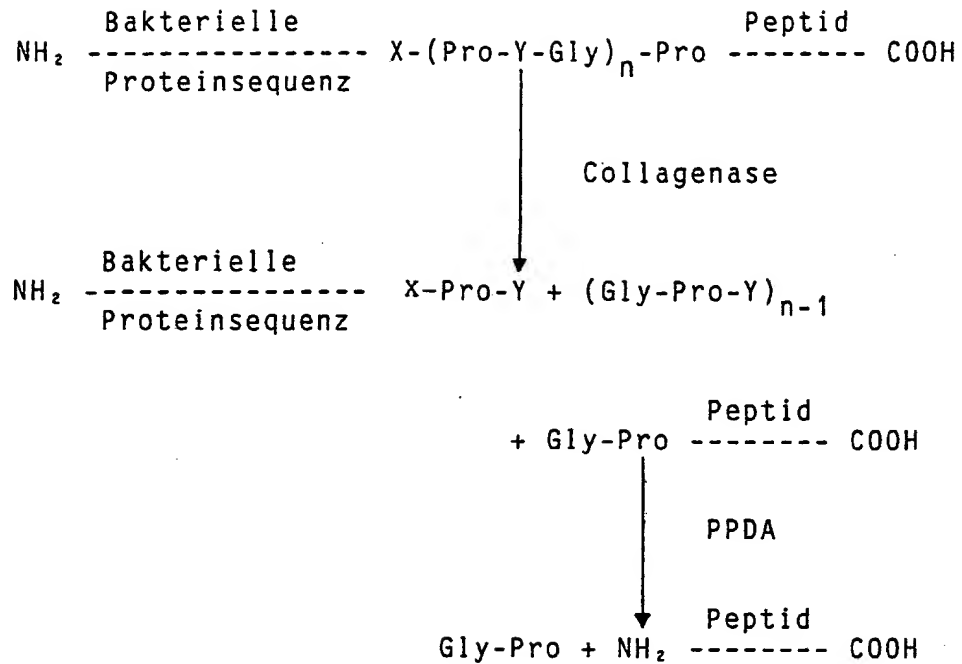
Z_2 das Zielpeptid aus beliebigen Aminosäuren des genetischen Codes bedeuten,

die C-terminal auf die Aminosäuresequenz $-\text{X}-(\text{Pro}-\text{Y}-\text{Gly})_n-\text{Pro}-$, in der X und Y jede genetisch kodierbare Aminosäure und $n \geq 2$ bedeuten, folgende Proteinsequenz enzymatisch mit Collagenase und Postprolindipeptidylaminopeptidase (PPDA) abspaltet.

Die Erfindung betrifft außerdem Fusionsproteine der Formel I und Verfahren zu ihrer Herstellung gemäß Ansprüchen 1 - 6, sowie Genstrukturen, die für Fusionsproteine der Formel I kodieren und Plasmide oder vergleichbare Vektoren (z.B. Phagenvektoren), die Codons für repetitive Collagenase-Schnittstellen enthalten und damit zur Herstellung von Fusionsproteinen der Formel I geeignet sind.

Als bakterielle Aminosäuresequenz Z_1 kommen alkalische Phosphatase, Anthranilat-Synthetase, β -Lactamase, β -Galactosidase, Chloramphenicol-Acetyltransferase etc. in Frage.

Das nachstehende Reaktionsschema erläutert die proteolytische Spaltung von Fusionsproteinen mit Collagenase und Postprolin-Dipeptidyl-Amino-peptidase (PPDA):



Für X und Y kann jede der im genetischen Code festgelegten 20 Aminosäuren stehen. n bedeutet bevorzugt 2 bis 10.

Der Vorteil des neuen Verfahrens zur Spaltung von Fusionsproteinen besteht gegenüber dem Verfahren aus EP 20290 darin, daß die Umsetzungsgeschwindigkeit z.B. mit Clostridiopeptidase A um Größenordnungen gesteigert werden kann. Fusionsproteine, die die Erkennungssequenz für Collagenase in repetitiver Form enthalten, lassen sich unvergleichlich viel besser spalten als die entsprechenden Fusionsproteine mit einer einfachen Spaltstelle für Collagenasen.

Zur Veranschaulichung des erfindungsgemäßen Verfahrens werden in den Beispielen 1-3 die Herstellung und enzymatische Spaltung von 3 Modellproteinen beschrieben, welche verschiedene, durch Collagenasen spaltbare Sequenzen enthalten. Die Aminosäuresequenzen dieser Proteine sind in Tab. 1 zusammengefaßt. Sie leiten sich von der Präphosphatase aus E.coli K 12 ab, einem Zwischenprodukt der Biosynthese von alkalischer Phosphatase, welche aus 471 Aminosäuren besteht. Durch Abspalten einer N-terminalen Signalsequenz von 22 Aminosäuren wird die Präphosphatase in das aktive Enzym überführt. Dagegen wird bei den modifizierten Phosphatasen die Signalsequenz von 22 Aminosäuren nicht in nennenswertem Umfang abgespalten.

Die Aminosäuresequenz der alkalischen Phosphatase (R.A. Bradshaw et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 4692-4696 [1981]) sowie die Nukleotidsequenz des entsprechenden Gens aus E.coli K12 (phoA) sind bekannt (M. Simonis, Dissertation, Freie Universität Berlin [1983]; C.N. Chang et al., Gene 44, 121-125 [1986]); Vektoren, die für die Konstruktion von Fusionsproteinen auf der Basis von alkalischer Phosphatase verwendet werden können, sind ebenfalls beschrieben worden (W. Boidol et al., Mol. Gen. Genet. 185, 510-512 [1982]; W. Boidol, Dissertation, Technische Universität Berlin [1984]). Ausgehend von einem dieser Plasmide, welches die Bezeichnung pSB94 trägt, wurden mit an sich bekannten Methoden der in vitro-Neukombination und DNA-Klonierung (T. Maniatis et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., USA [1982]) modifizierte Vektoren hergestellt, welche nach Überführung in geeignete E.coli-Wirtszellen die Bio-

synthese der in Tab. 1 dargestellten Proteine bewirken. Dazu wurden in zwei Positionen des phoA-Gens auf pSB94, nämlich in die NcoI- bzw. in die SphI-Sequenz, Oligonukleotide eingefügt, welche in den modifizierten Genen Codons für die durch Collagenasen erkennbaren Aminosäuresequenzen bilden. Restriktionskarten von pSB94 und der davon abgeleiteten Plasmide pSA302, pSA506 und pHS4133 sind in den Abb. 1-4 dargestellt.

Die Ergebnisse der Umsetzung der 3 Modellproteine mit Clostridiopeptidase A sind auf Seite 35 und 36 sowie in Tab. 2 dargestellt. S. 35 zeigt eine gelelektrophoretische Trennung, die die Entstehung von Spaltprodukten des erwarteten Molekulargewichtes und damit die spezifische Spaltung an der vorbestimmten Stelle belegt. Auf Seite 36 ist die Abhängigkeit der Produktbildung von der Inkubationszeit und der eingesetzten Enzymmenge dargestellt. Die aus den Kurven ermittelten Produktbildungsraten, die in Tab. 2 zusammengefaßt sind, machen deutlich, in welchem Umfang eine Doppelschnittstelle (HS 4133/1) und erst recht eine fünffache-Schnittstelle (SA 506/1) die Reaktionsfähigkeit gegenüber Collagenasen im Vergleich zu einer einfachen Schnittstelle (SA 302/1) erhöhen.

In der deutschen Patentanmeldung (Aktenzeichen P 37 31 875.6), deren Gegenstand ein Verfahren zur Herstellung von adrenocorticotropem Hormon und davon abgeleiteten Peptiden ist, werden Fusionsproteine beschrieben, in denen die Hormonsequenz über eine einfache bzw. repetitive Collagenase-Schnittstellen an Teilsequenzen der alkalischen Phosphatase aus E.coli gekoppelt sind. Die dort beschrie-

benen Versuche zur Umsetzung dieser Fusionsproteine mit Clostridiopeptidase A bestätigen in vollem Umfang die in der vorliegenden Erfindung beschriebenen Resultate. Die Produktbildungsraten der wichtigsten ACTH-Fusionsproteine sind ebenfalls in Tab. 2 enthalten. Während aus dem Protein mit einer einfachen Collagenase-Schnittstelle (SA186/1) das Peptidhormon nur unvollständig und unter Bedingungen freigesetzt werden konnte, die für eine praktische präparative Anwendung ungeeignet sind, wurde das entsprechende Protein mit einer doppelten Schnittstelle (SA343/1) bereits um einen Faktor von mindestens 10^3 besser gespalten. Durch Verwendung einer fünffachen bzw. einer achtfachen Schnittstelle (SA341/1 bzw. SA360/1) wurde die Reaktionsgeschwindigkeit weiter erhöht. Die Sequenz des ACTH-Fusionsproteins SA 341/1 ist in Tab. 1 dargestellt. Die Trennung auf Seite 35 zeigt in Spur 3 die Produkte der Umsetzung von SA341/1 mit Clostridiopeptidase A.

Die Umsetzung mit PPDA entsprechend dem bereits oben angegebenen Schema kann bei der Verwendung von repetitiven Collagenase-Schnittstellen nur dann zu dem authentischen Peptid mit der exakten Aminosäuresequenz am N-terminalen Ende führen, wenn innerhalb der repetitiven Schnittstelle auch die Y-Gly-Bindung gespalten wird, die dem N-terminalen Ende des Peptids am nächsten liegt. Analytische Untersuchungen durch Gelelektrophorese und HPLC ließen keine Heterogenität der Spaltprodukte aus Fusionsproteinen mit repetitiven Collagenase-Schnittstellen erkennen. Dies weist darauf hin, daß bei der Umsetzung mit Clostridiopeptidase A alle Y-Gly-Bindungen der repetitiven Sequenz geschnitten werden. Wie in der deutschen Patentanmeldung (Aktenzeichen P37 31 875.6) beschrieben, wurde dies am Beispiel

des entsprechenden Spaltproduktes aus SA 341/1 durch Bestimmung einer N-terminalen Partialsequenz bestätigt: der Edman-Abbau ergab die für die ersten sieben Aminosäuren von Gly-Pro-ACTH erwartete Sequenz. Offenbar werden durch Spalten einer ersten Bindung innerhalb einer repetitiven Sequenz die weiteren Spaltstellen durch Freilegung und bessere Zugänglichkeit so aktiviert, daß sie sehr viel rascher reagieren als die erste Spaltstelle, so daß Zwischenprodukte unvollständiger Spaltung nicht zu erfassen sind.

Durch die Verwendung repetitiver Collagenase-Schnittstellen wird die Spezifität des Verfahrens deutlich erhöht, und selbst Peptide, die zufällig die Sequenz Pro-X-Gly-Pro enthalten, könnten wegen der geringen Reaktionsfähigkeit dieser Sequenz unter den hier angewendeten Bedingungen hergestellt werden. Damit ist das Verfahren zur Herstellung praktisch jeden beliebigen Peptids geeignet, und auch in der Wahl der Wirts-/Vektor-Systeme sowie für die Verwendung anderer Collagenasen und Aminopeptidyl-Dipeptidasen ähnlicher Spezifität gibt es keinerlei Einschränkungen.

Das erfindungsgemäße Verfahren läßt sich natürlich auch in einem Schritt, d.h. bei gleichzeitiger Umsetzung mit Collagenase und PPDA, durchführen.

Am 16.07.1979 wurde bei der American Type Culture Collection (ATCC) in Rockville, Md., USA hinterlegt (Hinterlegungsnummer):

Plasmid pBR 322 (ATCC 40015).

Am 16.07.1979 wurde bei der DSM, Göttingen hinterlegt:

Escherichia coli SB 44 (DSM 1606).

Seit dem 26.11.1973 liegt bei der DSM eine Hinterlegung vor für:

Escherichia coli K 12 Wildtyp (DSM 498).

B E I S P I E L E

1. Herstellung von neukombinierten Plasmiden mit Genen für die Phosphataseproteine SA 302/1, SA 506/1 und HS 4133/1

Die Biosynthese der drei Proteine wird in entsprechend transformierten Bakterienzellen durch die neukombinierten Plasmide pSA302, pSA506 und pHS4133 determiniert. Diese Plasmide sind aus dem Vektorplasmid pSB94 entstanden. pSB94 wurde aus dem Plasmid pSB53 (hinterlegt am 16.7.79 unter der Nr. ATCC 40020) nach einem beschriebenen Verfahren (W.Boidol, Dissertation, Technische Universität Berlin [1984], siehe auch US-Patent Nr. 4,375,514) abgeleitet.

Herstellung des Plasmids pSB94 [W.Boidol, Dissertation
TU-Berlin D83/FB13, Nr. 158 (1984)]

Ausgehend vom Plasmid pSB53 [EP-Patent 23882, ATCC 40020 (16.7.79)] wurde das Plasmid pSB94 wie folgt hergestellt:

In einer Reaktionsmischung bestehend aus 60µl pSB53 (205µg/ml), 60µl Reaktionspuffer (20mM Tris HCl, 20mM MgCl₂, 150mM NaCl, 20mM Mercaptoäthanol, pH 7.5), 18µl Rinderserumalbumin (1mg/ml), 5µl Sal I, 5µl Xho I und 12µl H₂O wurde die pSB53-DNS 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Restriktionsendonukleasen Sal I und Xho I wurden von der Fa. Biolabs (USA) bezogen.

Die Reaktionsbedingungen, die zu einer quantitativen Spaltung von pSB53 (MG-Bestimmung mittels Gel-Elektrophorese) in Fragmente von 2255 bp und 6454 bp (MG-Bestimmung mittels Sequenzanalyse) führen, wurden in Vorversuchen ermittelt.

- 17 -

Die Trennung der beiden Fragmente erfolgte durch Agarose-Gelelektrophorese.

Das 6454 bp-Fragment wurde aus einem 0,7 % Agarosegel durch Elektroelution isoliert [T. Maniatis, E. Fritsch, J. Sambrook; Molecular Cloning, 164-165, Cold Spring Harbor Lab. New York (1982)] und in einem Ligaseansatz über die komplementären 5'-überhängenden Einzelstrangenden zu Ringmolekülen verknüpft. Die Ligasereaktion mit T4-Ligase (Biolabs, USA) erfolgte in einem Reaktionspuffer mit 50mM TrisHCl, 10mM MgCl₂, 20mM Dithiothreitol, 50µg/ml Rinderserumalbumin, 1mM ATP, pH 7.8. Der Ligaseansatz (100µl Volumen) wurde 16 Stunden bei 13°C inkubiert.

Die Reaktion wurde durch Phenolextraktion gestoppt und die DNS aus der wässrigen Phase nach dreimaliger Ätherextraktion mit Äthanol gefällt. Nach Zentrifugation wurde der DNS-Niederschlag in 50µl DNS-Puffer (45mM TrisHCl, 0,1mM EDTA, pH 7,9) gelöst und zur Transformation kompetenter Zellen des Stammes *Escherichia coli* SB44 eingesetzt [200µl kompetente Zellen +25µl der DNS aus dem Ligaseansatz].

Die Herstellung von kompetenten Zellen sowie Transformationsbedingungen entsprechen den in EP 23882 beschriebenen Verfahren und Bedingungen.

Aus den erhaltenen Transformanten (ampicillinresistente Zellen) wurde Plasmid-DNS isoliert und durch Restriktionsanalyse die Struktur des Plasmids bestätigt.

- 18 -

In Abb. 1 ist eine Restriktionskarte von pSB94 dargestellt. (Die Abstände zwischen den einzelnen Restriktionssequenzen sind in Basenpaaren (Bp) angegeben, die Gesamtgröße beträgt 6454 Bp.) Das Plasmid trägt das Gen für β -Lactamase (Ampicillin-Resistenz) aus pBR322 sowie das Gen für alkalische Phosphatase (phoA) aus E.coli K12. Zur Herstellung von pSA302 und pSA506 wurden entsprechende Oligonukleotide in die Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonukleasen NcoI bzw. SpI, die sich innerhalb des phoA-Gens befinden, durch DNS-Klonierung eingefügt. pHS4133 ist anschließend aus pSA506 durch Entfernung eines PstI-Fragmentes von 27 Bp hergestellt worden. In den Abb. 2-4 sind Restriktionskarten der drei neukombinierten Plasmide dargestellt:

zu Abb. 2: Die Zahlen 297 und 298 über der Aminosäureteilsequenz kennzeichnen die Aminosäuren der Prä-Phosphatase, zwischen welche in dem Protein SA302/1 die zusätzlichen 6 Aminosäuren eingefügt sind.

zu Abb. 3: Die Zahlen 447 und 448 über der Aminosäureteilsequenz kennzeichnen die Aminosäuren der Prä-Phosphatase, zwischen welche in dem Protein SA 506/1 die zusätzlichen 15 Aminosäuren eingefügt sind.

zu Abb. 4: Die Zahlen 447 und 448 über der Aminosäureteilsequenz kennzeichnen die Aminosäuren der Prä-Phosphatase, zwischen welche in dem Protein HS4133/1 die zusätzlichen 6 Aminosäuren eingefügt sind.

Bei der Herstellung der neukombinierten Plasmide wurden literaturbekannte Methoden der DNS-Klonierung angewendet. Diese sind von T. Maniatis et al. (Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., USA [1982]) ausführlich und zusammenfassend beschrieben worden. Als Wirtszelle dient der Stamm E.Coli SB 44 (W. Boidol, Dissertation, Technische Universität Berlin [1984]; G. Siewert et al., US-Patent Nr. 4 375 514 [1983]). Dies ist eine phosphatasenegative Mutante (phoA) des weit verbreiteten Klonierungsstammes E.coli HB 101 (hinterlegt am 16.7.79 unter der Nr. DSM 1607).

Oligonukleotide wurden mit Hilfe eines automatisierten DNS-Synthesegerätes, Modell 381A der Firma 'Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, Calif. 94 404, USA', nach den Angaben des Geräteherstellers synthetisiert und durch Gelelektrophorese gereinigt.

Die Sequenzierung von DNS erfolgte nach dem Didesoxy-Verfahren (F. Sanger et al., Proc.Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467 [1977]) unter Verwendung der Einzelstrang-Phagenvektoren M13mp18 und M13mp19 (C. Yanisch-Perron et al., Gene 33, 103-119 [1985]), die bei Boehringer (Mannheim), Pharmacia-LKB GmbH und vielen anderen Anbietern erhältlich sind.

Zur radioaktiven Markierung wurde Desoxyadenosin-5- $[\alpha\text{-}^{35}\text{S}]$ thiotriphosphat eingesetzt (M.D. Biggin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 3963-3965 [1983]).

Die Restriktionsendonukleasen EcoRI, PstI, SphI und HaeIII sowie DNS-Ligase (T4) wurden von der Firma Boehringer, Mannheim, bezogen. NcoI war von New England Biolabs GmbH, 6231 Schwalbach, und Polynukleotid-Kinase (T4) von Pharmacia/P-L, 7800 Freiburg i.Br.

1.1. Herstellung von pSA 302

Das Plasmid pSB94 wurde mit der Restriktionsendonuklease NcoI linearisiert. Dazu wurde eine Reaktionsmischung, welche 14 µg Plasmid-DNS und 17 Einheiten NcoI in 50 µl Reaktionspuffer (50 mM Tris HCl, 10 mM MgCl₂, 100 mM NaCl₂, 1 mM Dithiothreitol, pH 7.5) enthielt, 7 h bei 37 °C inkubiert. Nach Extraktion der Reaktionsmischung mit Phenol wurde die DNS mit Äthanol gefällt, getrocknet und im TE-Puffer (45 mM Tris HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5) gelöst.

Je 1 µg der beiden 18mer synthetischen Oligonukleotide

5'-CAT GGC CCT GCA GGA CCC-3'

und 5'-C ATG GGG TCC TGC AGG GC-3',

welche an der 5'-OH-Gruppe nicht phosphoryliert waren, wurden in wässriger Lösung gemischt und 15 Min bei 37 °C vorinkubiert. Sie wurden anschließend mit 3.5 µg linearisiertem pSB94 und 4 Einheiten DNS-Ligase (T4) in 50 µl Ligase-Reaktionspuffer (20 mM Tris HCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM Dithioerythrit, 0.6 mM ATP, pH 7.6) 2,5 h bei 20 °C umgesetzt. Die DNS wurde wie oben beschrieben durch Phenolextraktion und Äthanol-fällung aufgearbeitet und zur Transformation des Stammes E.coli SB 44 eingesetzt. Die Herstellung der kompetenten Zellen und die Transformation erfolgten nach einem Verfahren von M. Dagert und S.D. Ehrlich (Gene 6, 23-28 [1979]).

Die transformierten Zellen wurden zu Einzelkolonien ausplattiert. Kolonien, deren Plasmid-DNS die o.g. Oligonukleotidse-

quenzen enthielten, wurden durch Koloniehybridisierung identifiziert. Die Koloniehybridisierung wurde entsprechend dem von T. Maniatis et al. (Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., USA [1982]) angegebenen Basisprotokolle in einer von J.P. Gergen et al. (Nucleic Acids Research 7, 2115-2136 [1979]) beschriebenen Variante durchgeführt. Als radioaktives Hybridisierungsreagenz dienten die o.g. Oligonukleotide, die durch Umsetzung mit $\gamma\text{-P}^{32}\text{-ATP}$ und Polynukleotid-Kinase (T4) zuvor mit 5'- P^{32} -Phosphat markiert worden waren.

In den neukombinierten Plasmiden der positiven Klone wurde die Orientierung des synthetischen NcoI-Fragmentes von 18 Bp durch Restriktionsanalyse ermittelt. Dazu wurde nach Standardverfahren Plasmid-DNS isoliert und mit der Restriktionsendonuklease HaeIII umgesetzt. Die entstandenen Fragmentmischungen wurden durch Gelelektrophorese analysiert (Molekulargewichtsbestimmung durch Vergleich mit HaeIII-geschnittenem pBR322 in einem 8 %igen Polyacrylamidgel).

Die für die Integration des synthetischen Fragmentes von 18 Bp verwendete NcoI-Schnittstelle ist in pSB94 auf einem HaeIII-Fragment von 385 Bp lokalisiert. Dieses Fragment muß in den neukombinierten Plasmiden fehlen und durch zwei neue Fragmente ersetzt sein, da das 18 Bp-Fragment selbst eine HaeIII-Sequenz trägt. Die Größe der beiden neuen Fragmente hängt von der Orientierung des 18 Bp-Fragmentes ab: in der gewünschten, in Abb. 2 dargestellten Orientierung werden Fragmente von 342 Bp und 61 Bp erwartet, während die entgegengesetzte Orientierung Fragmente

von 330 Bp und 73 Bp ergibt. Es wurden mehrere Plasmide beider Orientierungen gefunden. Das in Abb. 2 dargestellte pSA302 ist eines der Plasmide mit der gewünschten Orientierung.

Das EcoRI-Fragment von 349 Bp aus pSA302, welches die durch Klonierung eingefügte synthetische DNS enthält, wurde in den Sequenziervektor M13mp19 kloniert und, wie oben angegeben, sequenziert. Die in Abb. 2 dargestellte Teilsequenz von pSA302 zwischen den beiden EcoRI-Schnittstellen ließ sich voll bestätigen.

1.2. Herstellung von pSA506

Die Herstellung erfolgte ähnlich die diejenige von pSA302. pSB94 wurde mit der Restriktionsendonuklease SphI linearisiert; Reaktionsbedingungen und Aufarbeitung waren die gleichen wie für pSA302 beschrieben.

Die beiden 45mer Oligonukleotide

5'-GTCCTGCAGGCCCCGGCGGGTCCAGCAGGCCCTGCAGGTCCGCATG-3'

und 5'-CGGACCTGCAGGGCCTGCTGGACCCGCCGGGCCTGCAGGACCATG-3'

wurden mit SphI-linearisiertem pSB94 und DNS-Ligase unter den gleichen Bedingungen, wie für pSA302 beschrieben, umgesetzt und aufgearbeitet. Nach Transformation von E.coli SB 44 wurden positive Klone durch Koloniehybridisierung mit den P³²-endmarkierten 45mer Oligonukleotiden identifiziert.

Die so erhaltenen neukombinierten Plasmide haben nur auf einer Seite des aus den beiden 45mer-Oligonukleotiden gebildeten DNS-Abschnittes eine intakte SphI-Sequenz. Diese hat in den gesuchten Plasmiden einen Abstand von 257 Bp von der nächstgelegenen EcoRI-Sequenz (vergl. Abb. 3), während diese Distanz in den Plasmiden der entgegengesetzten Orientierung genau wie in pSB94 nur 212 Bp beträgt.

Die Größenbestimmung der DNS-Fragmente, die durch Umsetzung der neukombinierten Plasmide mit den Restriktionssequenzen EcoRI und SphI erhalten wurden, durch Gelelektrophorese zeigte, daß pSA506 eines der Plasmide mit der gewünschten Orientierung des synthetischen DNS-Fragmentes ist. Zur Bestätigung der in Abb. 3 dargestellten Sequenz wurde das EcoRI/SphI-Fragment von 257 Bp in den Sequenziervektor M13mp18 kloniert und sequenziert.

1.3. Herstellung von pHS4133

Eine Reaktionsmischung aus 3 µg DNS des Plasmids pSA506 und 5 Einheiten des Restriktionsenzym PstI in 50 µl Reaktionspuffer (wie in 1.1.) wurde 2 h bei 37 °C inkubiert und wie in Beispiel 1.1. aufgearbeitet. Es entstanden 3 DNS-Fragmente (27 Bp, 2420 Bp und 4007 Bp), die durch Elektrophorese in einem 1 %igen Agarosegel voneinander getrennt wurden. Die beiden größeren Fragmente wurden durch Elektroelution aus dem Gel isoliert, vereinigt und mit DNS-Ligase (T4) unter Reaktionsbedingungen wie in Beispiel 1.1. umgesetzt, aufgearbeitet und zur Transformation

von E.coli SB 44 eingesetzt. Aus einigen Ampicillin-resistenten Klonen wurde Plasmid-DNS isoliert. Eines von diesen ist pHS4133, dessen Restriktionskarte in Abb. 4 dargestellt ist. pHS4133 leitet sich aus pSA506 durch eine Deletion ab, die zu einer Größenverminderung des EcoRI/SphI-Fragmentes von 257 auf 230 Bp führt. Dieses Fragment wurde wie in Beispiel 1.2. in M13mpl8 kloniert und sequenziert. Dabei ließ sich die in Abb. 4 angegebene Nukleotidsequenz bestätigen.

2. Herstellung der Proteine SA 302/1, SA 506/1 und HS 4133/1

Die drei Proteine wurden durch Fermentation der in Teil 1 der Beispiele beschriebenen Stämme

E.coli SB44 (pSA302) ,

E.coli SB44 (pSA506)

und E.coli SB44 (pHS4133)

erhalten. Ihre Biosynthese ist in der gleichen Weise wie diejenige von alkalischer Phosphatase reguliert: sie wird durch anorganisches Phosphat reprimiert und ist umgekehrt in phosphatarmen Medien induziert (A. Torriani, Biochem. Biophys. Acta 38, 460-469 [1960]).

Zur Identifizierung der Phosphatase-Derivate wurde u.a. das Immunblot-Verfahren nach H. Towbin et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 4350-4354 [1979]) angewendet. Das dafür benötigte Antiserum war durch Immunisierung von Kaninchen mit gereinigter alkalischer Phosphatase aus E.coli K12 unter Standardbedingungen

(vergl. D.M. Weir, Handbook of Experimental Immunology, Vol. III, Blackwell Scientific Publ, Oxford 1978) hergestellt worden. Die zur Immunisierung eingesetzte Phosphatase wurde nach bekannten Verfahren (A. Torriani, in: 'Methods in Enzymology', Vol. XIIB, 212-218, L. Grossman, K. Moldave (Eds.) Academic Press, New York [1968]) isoliert. Als zweiter Antikörper diente ein Ziegen-Antiserum gegen Kaninchen-IgG, an welches alkalische Phosphatase als Marker-Enzym gekoppelt war (Cooper Biomedical Inc., Malvern, USA). 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat wurde als Farbreagenz verwendet.

Die drei Proteine sowie auch die drei o.g. Stämme, von denen sie produziert werden, sind untereinander so ähnlich, daß für alle das gleiche Fermentations- und Isolierungsverfahren angewendet werden kann.

2.1. Fermentation

20 ml L-Medium (E.S. Lennox, Virology 1, 190-206 [1955]), die zusätzlich 100 µg/ml Ampicillin enthielten, wurden mit einer Einzelkolonie beimpft, 24 h bei 37 °C geschüttelt und anschließend in 800 ml des gleichen Mediums überführt, die wiederum 16 h bei 37 °C geschüttelt wurden. Diese Vorzucht wurde in einem 20 l-Glasfermenter überführt, in dem sich 9,2 l Niedrigphosphatmedium befanden (LP-Medium nach K. Kreuzer et al., Genetics 81, 459-468 [1975]). Der Fermenter wurde 6 h bei 37 °C und einer Belüftung von 10 l/min mit 220 min⁻¹ gerührt. Anschließend wurden die Zellen in einer Durchflußzentrifuge geerntet, wobei ca. 30 g feuchte Zellmasse erhalten wurde.

2.2. Isolierung von angereicherten Proteinextrakten

30 g feuchte Zellen aus 2.1. wurden in 400 ml Aufschlußpuffer (50 mM Tris HCl, 160 mM NaCl, pH 8.0) suspendiert. Nach Zugabe von Phenylmethylsulfonylfluorid (Endkonzentration 10 mM) und DNase (DNase I aus Rinderpankreas, Fa. Boehringer/Mannheim, Reinheitsgrad I; 10 µg/g feuchte Zellen) wurde die Suspension in einem Zellhomogenisator (Manton-Gaulin) bei einem Druck von 650-700 kg/cm² (10 000 Psi) in einem Kühlraum (4 °C) aufgeschlossen. Der Aufschluß wurde zweimal wiederholt, nach jedem Durchgang wurde die Suspension in Eis gekühlt. Die unlöslichen Zellbestandteile wurden durch Zentrifugation abgetrennt (20 min. bei 10 000 x g und 4 °C), zweimal mit Aufschlußpuffer gewaschen und in 50 mM Tris HCl, pH 8.0/8 M Harnstoff (60 ml) gelöst. Die Lösung wurde durch Zentrifugation von unlöslichen Bestandteilen befreit und bis zur weiteren Reinigung durch Gradientenchromatographie in Eis aufbewahrt.

2.3. Identifizierung der Phosphatase-Derivate

Hauptproteinbestandteil (ca. 50-70 %) der in 2.2. erhaltenen Proteinextrakte in Harnstoffpuffer ist das jeweilige Phosphatase-Derivat. Nach Trennung der Proteinmischungen durch Elektrophorese in SDS-Polyacrylamidgelen unter Standardbedingungen (U.K. Laemmli, Nature 227, 680-685 [1970]) wurden die entsprechenden Proteinbanden anhand folgender Kriterien identifiziert:

- a) Die stärkste Bande des Proteingemisches hat ein Molekulargewicht, welches der in Tab. 1 angegebenen Aminosäuresequenz entspricht.
- b) Dieses Protein ist durch Phosphat reprimierbar, d.h. die Bande fehlt, wenn die Zellen wie in 2.1., jedoch mit der 10-fachen Phosphatkonzentration fermentiert wurden.
- c) Die Bande ist plasmidspezifisch, sie fehlt in Zellen des plasmidfreien Stammes E.coli SB 44, der unter den gleichen Bedingungen wie in 2.1. hergestellt wurde.
- d) Die Bande reagiert im Immunblot spezifisch mit Antiserum gegen gereinigte alkalische Phosphatase aus E.coli K12.

Aus gelelektrophoretischen Molekulargewichtsbestimmungen mit Hilfe eines Standardproteingemisches (Low Molecular Weight Proteins der Firma Pharmacia) ist zu erkennen, daß die Phosphatase-Derivate in der sogen. Prä-Form vorliegen, d.h. noch die Signalsequenz der alkalischen Phosphatase enthalten. Die Proteine sind in verdünntem Puffer relativ schwer löslich. Daher lassen sich in den nach Zellaufschluß und Zentrifugation erhaltenen Überständen nur geringe Mengen nachweisen.

2.4. Reinigung der Phosphatase-Derivate

Die in 2.2. erhaltenen Proteinextrakte wurden zur weiteren Reinigung der modifizierten Phosphatasen durch Gradientenchromatographie mit Hilfe eines Mitteldruck-Chromatographiegerätes (FPLC) der Fa. Pharmacia, Uppsala/Schweden, aufgetrennt. Eine Anionenaustauschersäule des gleichen Herstellers (Typ Mono Q-HR 5/5)

wurde mit Puffer A (50 mM Tris HCl, 8 M Harnstoff, pH 8.0) equilibriert, mit der Proteinlösung aus 2.1. beladen und schließlich mit einem aus Puffer A und Puffer B (50 mM Tris HCl, 1 M NaCl, 8 M Harnstoff, pH 8.0) gebildeten Gradienten von 0-200 mM NaCl mit einer Durchflußrate von 1.0 ml/min eluiert. Das gesamte Gradientenvolumen betrug 20 ml, es wurden Fraktionen von je 1 ml gesammelt.

Die Extinktion des Eluats bei 280 nm wurde mit einem Durchflußplotometer registriert. Die Proteinzusammensetzung der einzelnen Fraktionen wurde durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese analysiert. Die Phosphatase-Derivate eluierten bei 50-70 mM NaCl. Die entsprechenden Fraktionen wurden vereinigt und gegen das 400-fache Volumen Puffer (50 mM Tris HCl, 150 mM NaCl, pH 8.0) dialysiert. Die Proteine blieben unter diesen Bedingungen gelöst und wurden in dieser Form für die anschließende Spaltung mit Kollagenase eingesetzt. Die Reinheit der Präparationen wurde durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese kontrolliert (siehe s. 35 , Spur 4, 6 und 8), sie war größer als 90 %. Der Proteingehalt wurde nach W. Schaffner et al. (Anal. Biochem. 56, 502-514 [1973]) mit Amidoschwarz 10B bestimmt, die Konzentrationen betrugen 0.6-0.7 mg/ml. Aus einer 10 l-Fermentation wurden ca. 160 mg Protein erhalten.

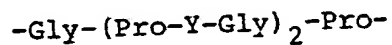
3. Spezifische Spaltung der modifizierten Phosphatase-Proteine mit Kollagenase

3.1. Reinigung der Kollagenase

Clostridiopeptidase A aus *Clostridium histolyticum* (EC 3.4.24.3) wurde von der Fa. Sigma Chemie GmbH, D-8024 Deisenhofen, Grünwalder Weg 30, bezogen (Typ VII, Best.-Nr. C0773). Das Enzym wurde durch Gradientenchromatographie unter Verwendung des FPLC-Gerätes und der gleichen Anionenaustauschersäule wie in Beispiel 2.4. weiter gereinigt. Es wurden 2 mg Kollagenase eingesetzt und mit einem aus Puffer A (10 Tris HCl, 5 mM CaCl_2 , pH 8.0) und Puffer B (10 mM Tris HCl, 5 mM CaCl_2 , 1 mM NaCl, pH 8.0) gebildeten Gradienten von 0-200 mM NaCl mit einer Durchflußgeschwindigkeit von 0.5 ml/min eluiert. Das Gesamtvolumen des Gradienten betrug 20 ml. Die Kollagenase-Aktivität wurde mit einem von E. Wünsch et al. (Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 333, 149-151 [1963]) beschriebenen Test ermittelt. Die aktivste Fraktion hatte einen Proteingehalt von 0.8 mg/ml und eine spezifische Aktivität von 2500 Einheiten/mg. Die im Folgenden beschriebenen Spaltversuche wurden mit dieser Fraktion ausgeführt, die bei -20 °C aufbewahrt wurde.

3.2. Spaltung von HS 4133/1

Das einkettige Protein hat eine Länge von 477 Aminosäuren (Molekulargewicht 49 919). Es enthält die durch Kollagenasen spaltbare Sequenz



wobei für Y einmal His und einmal Ala steht (vergl. Tab. 1).

Durch Spaltung beider Y-Gly-Bindungen entstehen zwei Proteine mit Längen von 447 Aminosäuren (MG. 46 880) und 27 Aminosäuren (MG. 2832) sowie das Tripeptid Gly-Pro-Ala. Um die Reaktionsfähigkeit der verschiedenen Phosphatase-Derivate gegenüber Kollagenase miteinander vergleichen zu können, wurde die Bildung des größten Spaltproduktes in Abhängigkeit von der Reaktionszeit und der Enzymmenge gemessen.

Eine Reaktionsmischung, welche 53 µg HS 4133/1 und 0.1 Einheit Clostridiopeptidase A in 100 µl Reaktionspuffer (90 mM Tris HCl, 5 mM CaCl₂, 120 mM NaCl, pH 8.0) enthielt, wurde 2,5 h bei 37 °C inkubiert. In Zeitabständen von 15 bis 30 Min. wurden Proben von je 10 µl entnommen und durch Zugabe von 3 µl Probenpuffer (10 % Saccharose, 10 % Natriumdodecylsulfat, 1 mM Dithiothreitol, 2 mM EDTA) sowie durch fünfminütiges Erhitzen auf 95 °C sofort gestoppt.

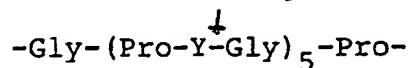
Die Proben wurden durch Elektrophorese in einem SDS-Polyacrylamid-Gradientengel (Gradient von 12,5 % bis 25 % Acrylamid mit konstant 0,33 % Bisacrylamid) getrennt. Nach Anfärben mit Coomassie Brilliant Blue G wurde das Gel entsprechend den Protein-

bahnen in Streifen geschnitten und mit einem Gel-Scanner (Fa. Isco, optische Einheit Typ 6, Absorptionsmonitor UA-5) bei 280 nm quantitativ ausgewertet. Mit Hilfe einer entsprechenden Eichkurve, die mit einem gereinigten Phosphatase-Protein erhalten worden war, wurden die Proteingehalte für die Banden des größten Spaltproduktes aus den Peakhöhen ermittelt. Die Ergebnisse sind auf S. 36 zusammengefaßt. Aus den Daten ergibt sich eine Produktbildungsrate von 21.0 pMol/min/Enzymeinheit für HS 4133/1.

Die Trennung auf S. 35 zeigt in Spur 7 eine gelelektrophoretische Trennung des größten Spaltproduktes aus einer Probe von HS 4133/1 nach vollständiger Umsetzung mit Clostridiopeptidase A.

3.3. Spaltung von SA 506/1

Das einkettige Protein hat eine Länge von 486 Aminosäuren (MG. 50 596) und enthält die durch Kollagenase spaltbare Sequenz



wobei für Y einmal His und viermal Ala steht (vergl. Tab. 1). Bei Spaltung aller Y-Gly-Bindungen entstehen die gleichen Proteine wie aus HS 4133/1 (vergl. 3.2.) und 4 Mol Gly-Pro-Ala je Mol Substrat. Die Bestimmung der Reaktionsfähigkeit von SA 506/1 gegenüber Clostridiopeptidase A erfolgte in der gleichen Weise wie bei HS 4133/1.

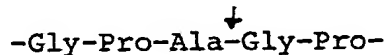
Der Reaktionsansatz enthielt 53 µg S. 506/1 in 100 µl und hatte die gleichen Enzym- und Pufferkonzentrationen wie der Ansatz für

HS 4133/1. Er wurde 80 Min. bei 37 °C inkubiert. In Abständen von 10 bis 15 Min. wurden 10 µl-Proben genommen und, wie in 3.2. beschrieben, gestoppt und nach Gelelektrophorese mit einem Gel-Scanner analysiert. Die Ergebnisse sind auf S. 36 dargestellt. Die Produktbildungsrate betrug 60 p Mol/min/Enzymeinheit.

Die Trennung auf S. 35 zeigt in Spur 5 das größte Reaktionsprodukt aus SA 506/1 nach quantitativer Umsetzung mit Clostridiopeptidase A.

3.4. Spaltung von SA 302/1

Das einkettige Protein hat eine Länge von 477 Aminosäuren und enthält die durch Kollagenase spaltbare Sequenz



(vergl. Tab. 1). Es entstehen zwei Spaltprodukte mit Längen von 301 Aminosäuren (MG. 31 269) und 176 Aminosäuren (MG. 18 668). Wegen der geringen Reaktionsfähigkeit von SA 302/1 wurde nur ein ungefährender Wert für die Produktbildungsrate ermittelt.

Eine Reaktionsmischung, welche 5 µg SA 302/1 und 1,0 Einheit Clostridiopeptidase A in 15 µl Reaktionspuffer (wie in 3.2.) enthielt, wurde 15 h bei 37 °C inkubiert und dann, wie in 3.2. beschrieben, durch Zugabe von Probenpuffer und Erhitzen gestoppt und durch Gelelektrophorese und Auswertung mit einem Gel-Scanner analysiert. Es waren ca. 0,02 p Mol/min/Enzymeinheit des größeren Reaktionsproduktes gebildet worden. Auf Seite 35 ist in Spur 9 die entsprechende gelelektrophoretische Trennung dargestellt.

Tab. 1: Aminosäure-Sequenzen der von alkalischer Phosphatase (AP) abgeleiteten Modell- und Fusionsproteine

Protein- bezeichnung		
SA506/1	Phos(1-444)-Gly-Pro-His-Gly-(Pro-Ala-Gly) ₄ -Pro-His-Phos(448-471)	(486 AS)
HS4133/1	Phos(1-444)-Gly-Pro-His-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-His-Phos(448-471)	(477 AS)
SA302/1	Phos(1-297)-His-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-His-Gly-Phos(300-471)	(477 AS)

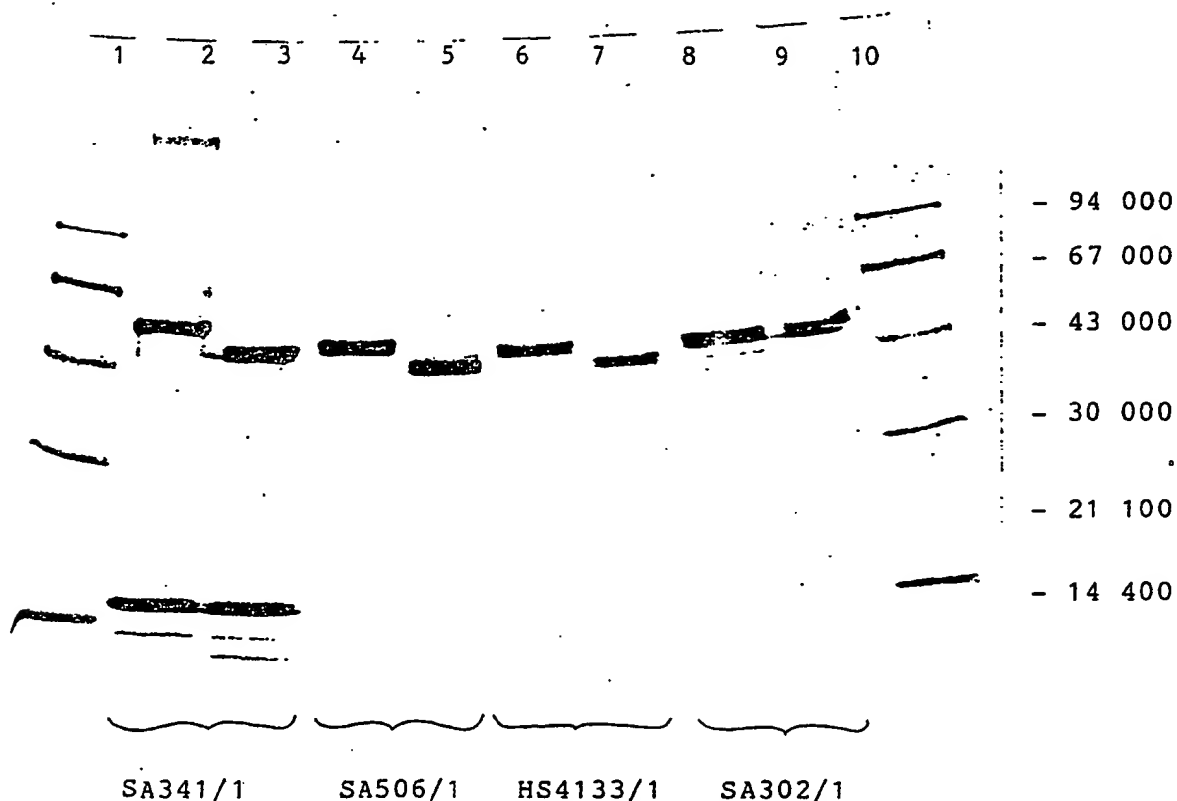
SA341/1	Phos(1-444)-Gly-Pro-His-Gly-(Pro-Ala-Gly) ₄ -Pro-ACTH(1-39)	(500 AS)

Die Phosphatasesequenzen auf beiden Seiten der Collagenase-Schnittstellen sind durch die Abkürzung 'Phos' sowie die in Klammern gesetzten Positionsnummern der ersten und letzten Aminosäure der jeweiligen Teilsequenz gekennzeichnet, wobei sich die Nummerierung auf die native Prä-Phosphatase (471 Aminosäuren) aus E.coli K12 bezieht. Die Sequenz für ACTH (1-39) ist in der deutschen Patentanmeldung (Aktenzeichen P 37 31 875.6) dargestellt.

Tab. 2: Produktbildungsraten für die Umsetzung der modifizierten Prä-Phosphatasen (Tab. 1) und der Prä-Phosphatase/ATCH-Fusionsproteine (s. Aktenzeichen P.3731 875.6) mit Clostridiopeptidase A

Protein- bezeichnung	Zahl der repetitiven Collagenase- Schnittstellen n	Produktbildungs- rate pMol/min/Enzym- einheit
SA302/1	1	~ 0,02
HS4133/1	2	21,0
SA506/1	5	59,8
SA186/1	1	< 0,01
SA343/1	2	40
SA341/1	5	350
SA360/1	8	540

Abb. 5: Gelelektrophoretische Trennung der Phosphatase-Proteine aus Tabelle 1 sowie der daraus durch Umsetzung mit Clostridiopeptidase A erhaltenen Reaktionsprodukte



Reihe 1 und 10 : Molekulargewichtsmarke

Reihe 2, 4, 6 und 8: Proteine aus Tabelle 1

Reihe 3, 5, 7 und 9: Produkte nach Spaltung mit Clostridiopeptidase A

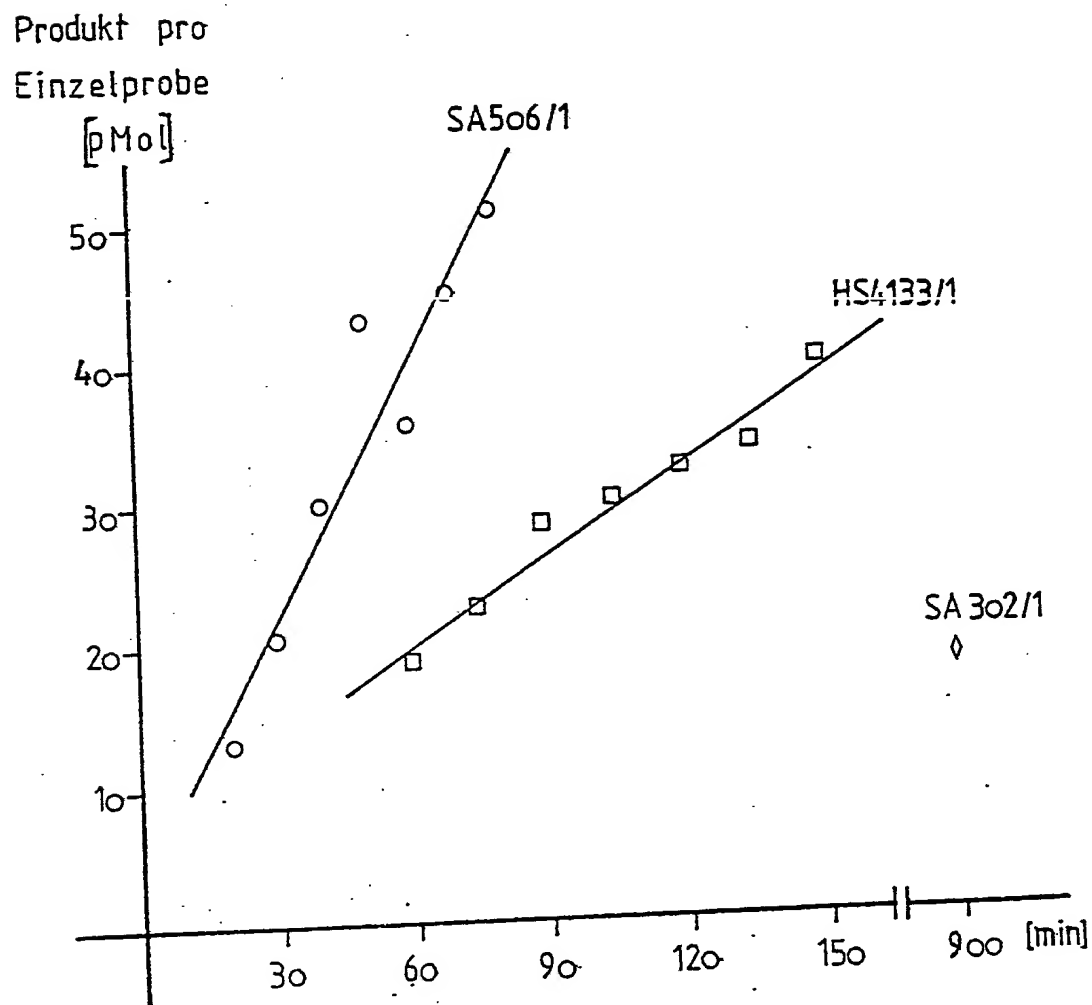
Das in Reihe 2 und 3 eingesetzte Fusionsprotein war nicht durch Gradientenchromatographie gereinigt worden.

Die Bande mit dem niedrigsten Molekulargewicht in Reihe 3 ist Gly-Pro-ACTH (1-39).

In Reihe 5 und 7 ist nur das hochmolekulare Spaltprodukt zu erkennen, das niedermolekulare Produkt hat das Gel vollständig durchlaufen.

In Reihe 9 sind außer den Produkten der Spaltung mit Clostridiopeptidase A (ME 31 200 und 18 700) auch Produkte unspezifischer Spaltung enthalten.

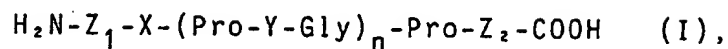
Abb. 6 : Zeitabhängigkeit der Umsetzung der Proteine SA302/1, HS4133/1 und SA506/1 mit Clostridiopeptidase A



Die Reaktionsbedingungen sind in Beispiel 3.2 - 3.4 beschrieben.
Die Werte für SA506/1 und HS4133/1 wurden mit je 0,01 Einheit
und für SA302/1 mit 1,0 Einheit Clostridiopeptidase A erhalten.

Patentansprüche

1. Fusionsprotein der allgemeinen Formel I



in der

 $n \geq 2$ ist,

X und Y jede der 20 durch den genetischen Code festgelegten Aminosäuren darstellt,

Z_1 eine bakterielle Aminosäuresequenz und

Z_2 das Zielpeptid aus beliebigen Aminosäuren des genetischen Codes bedeuten.

2. Fusionsprotein nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß n 2 bis 10 ist und X für Gly steht.

3. Fusionsprotein nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß Z_1 eine Sequenz von 444 Aminosäuren im Bereich der Aminosäuresequenz 1 - 444 der Präphosphatase aus E.coli K 12 darstellt.

4. Fusionsprotein nach Anspruch 1 - 3, dadurch gekennzeichnet, daß Z_2 eine Aminosäuresequenz von humanem ACTH bedeutet.
5. Verfahren zur Herstellung von Fusionsproteinen der Formel I, dadurch gekennzeichnet, daß man eine für Proteine der Formel I kodierende Genstruktur in einer bakteriellen Wirtszelle exprimiert und das Fusionsprotein über Trennverfahren erhält.
6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß man als bakterielle Wirtszelle E.coli einsetzt.
7. Genstrukturen, kodierend für Fusionsproteine der Formel I.
8. Plasmide oder vergleichbare Vektoren, die Codons für repetitive Collagenase-Schnittstellen enthalten und damit zur Herstellung von Fusionsproteinen nach Anspruch 1 geeignet sind.
9. Plasmid pSA 506
10. Plasmid pHS 4133
11. Verfahren zur Herstellung eines eukaryotischen Proteins, dadurch gekennzeichnet, daß man aus einem Fusionsprotein der Formel I enzymatisch die C-terminal auf die Aminosäuresequenz $-X-(\text{Pro-Y-Gly})_n\text{-Pro-}$, in der X und Y jede genetisch kodierbare Aminosäure und $n \geq 2$ bedeuten, folgende Proteinsequenz abspaltet.

12. Verfahren zur Herstellung eines eukaryotischen Proteins nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß man die Y-Gly-Bindungen in der Aminosäuresequenz $-X-(\text{Pro-Y-Gly})_n\text{-Pro}$ mit einer Collagenase selektiv spaltet und anschließend den N-terminalen Gly-Pro-Rest mit einer Postprolindipeptidyl-aminopeptidase abspaltet.

- 1/4 -

ZEICHNUNGEN

Abb. 1 : Restriktionskarte des Plasmids pSB 94 (6454 Bp)

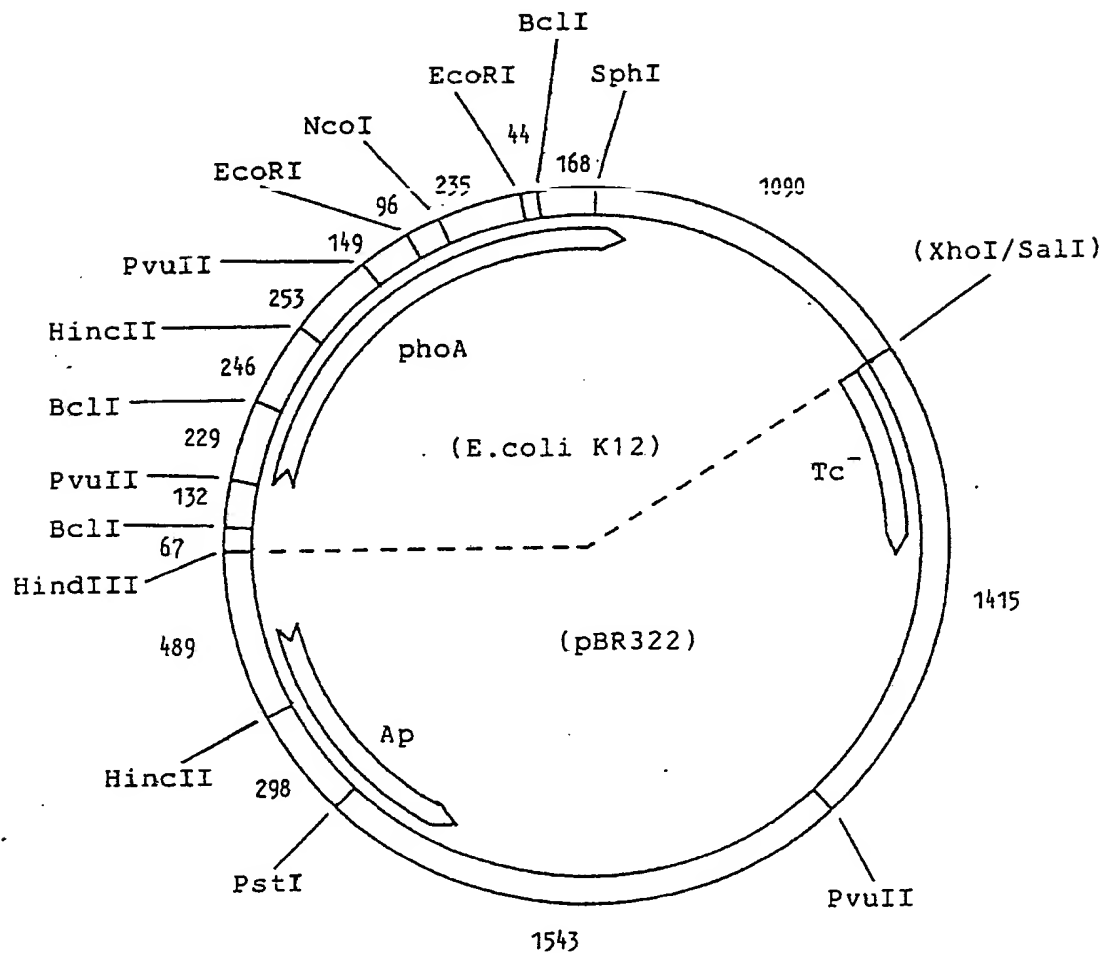


Abb. 2: Restriktionskarte des Plasmids pSA302

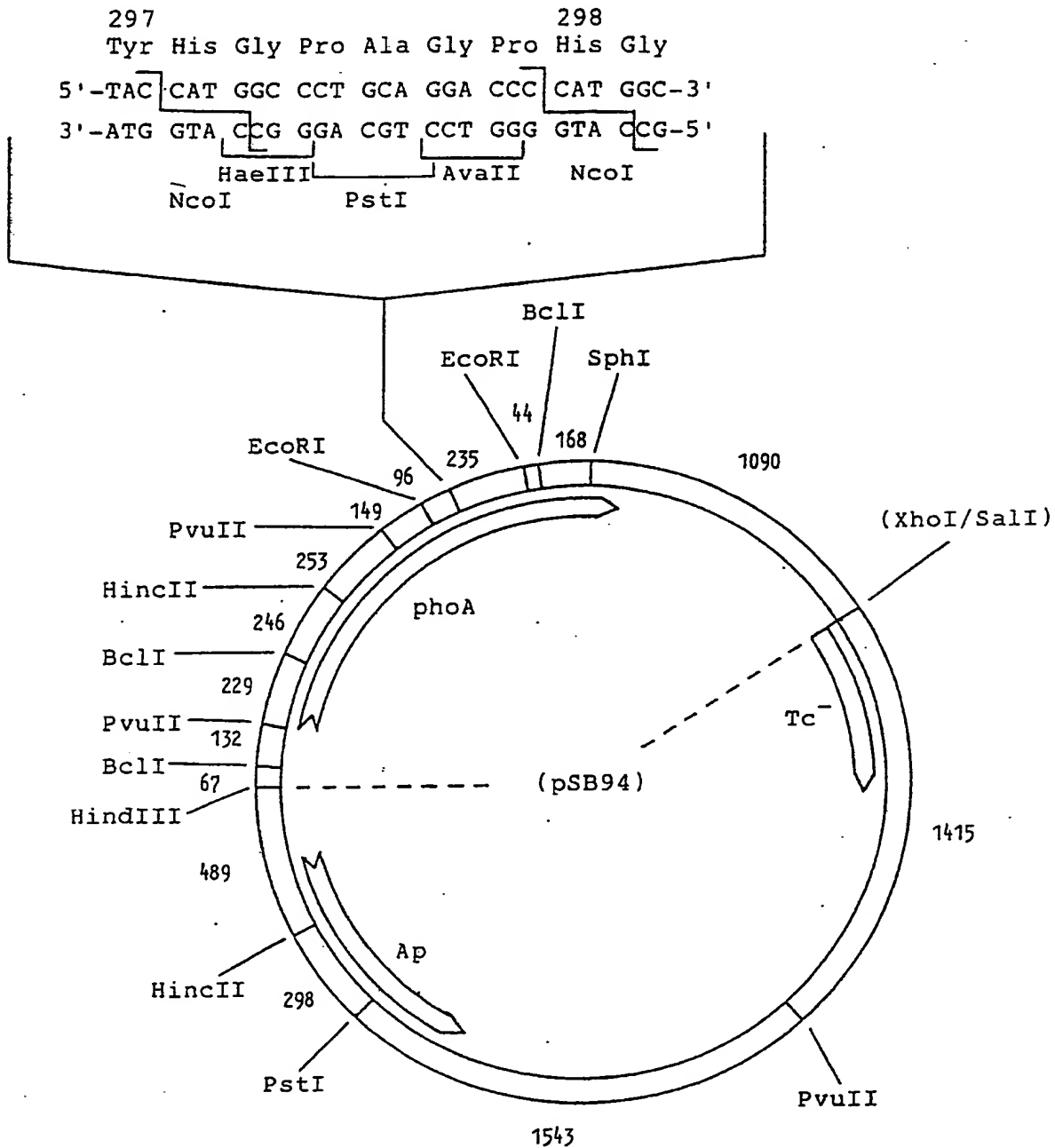


Abb. 3 : Restriktionskarte des Plasmids pSA506

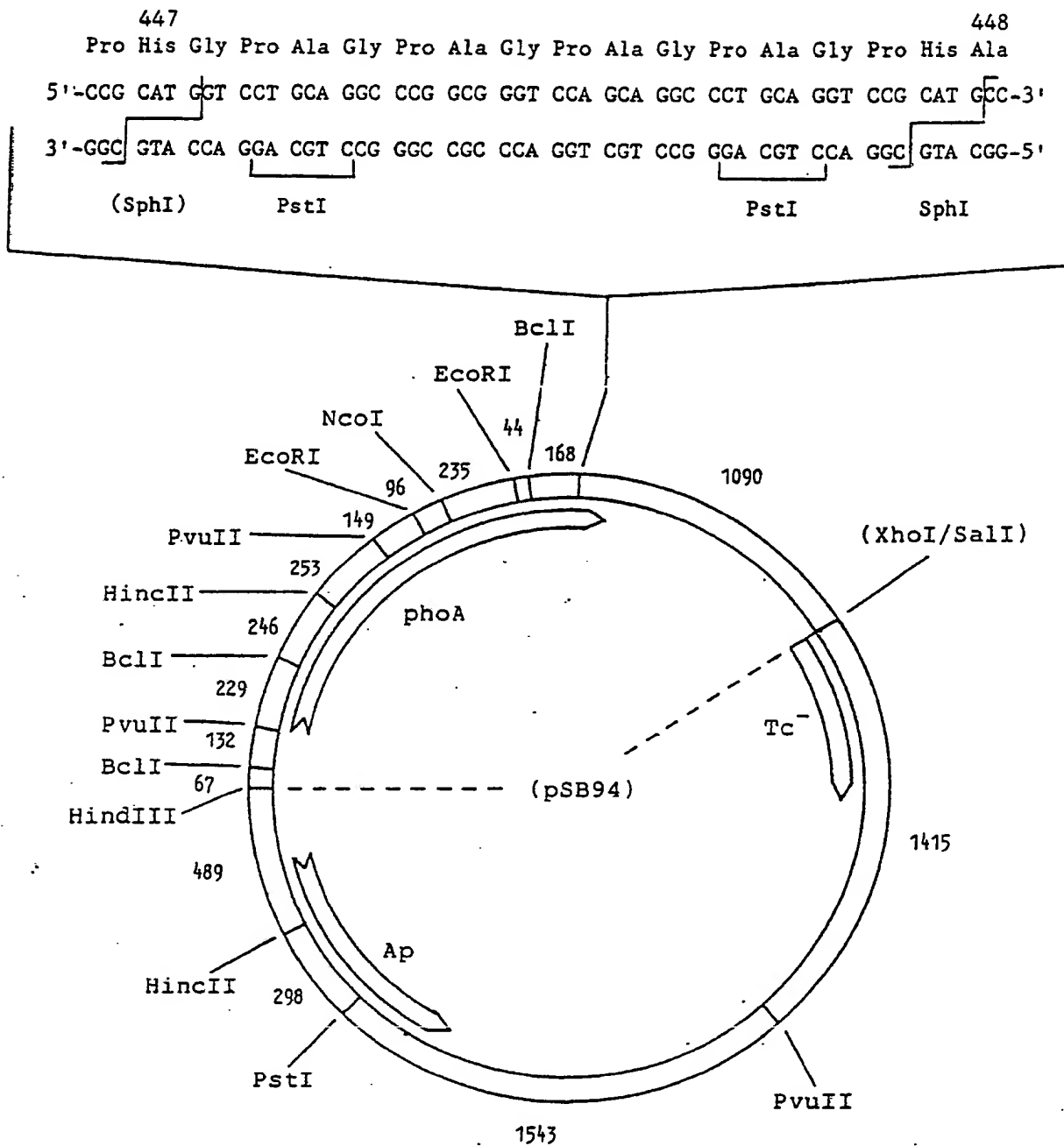
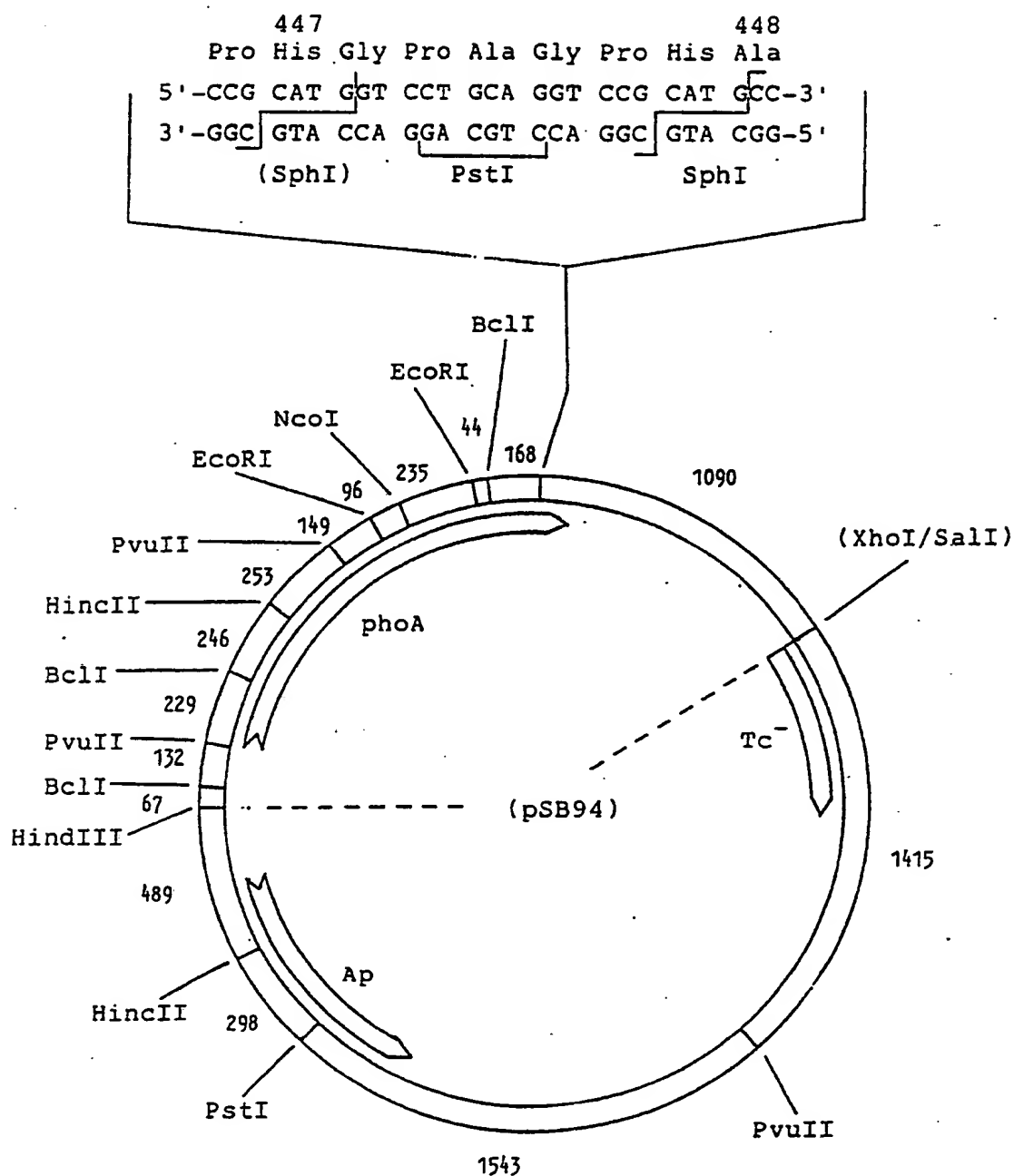


Abb. 4: Restriktionskarte des Plasmids pHS4133



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/DE 88/00535

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (If several classification symbols apply, indicate all) ⁶ According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC <div style="text-align: center; font-family: monospace;">Int. Cl.⁴ C 12 N 15/00; C 12 P 21/00</div>																	
II. FIELDS SEARCHED <div style="text-align: center; font-size: small;">Minimum Documentation Searched ⁷</div> <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 25%; border-bottom: 1px solid black; font-size: small;">Classification System</td> <td style="border-bottom: 1px solid black; font-size: small;">Classification Symbols</td> </tr> <tr> <td style="border: none; padding-top: 10px;">Int. Cl.⁴</td> <td style="border: none; padding-top: 10px;">C 12 N; C 12 P</td> </tr> </table> <div style="text-align: center; font-size: x-small; margin-top: 10px;">Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched ⁸</div>			Classification System	Classification Symbols	Int. Cl. ⁴	C 12 N; C 12 P											
Classification System	Classification Symbols																
Int. Cl. ⁴	C 12 N; C 12 P																
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ⁹ <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; font-size: small;"> <thead> <tr> <th style="width: 10%;">Category [*]</th> <th style="width: 60%;">Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²</th> <th style="width: 30%;">Relevant to Claim No. ¹³</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top;">A</td> <td>EP, A, 0 020 290 (SCHERING AKTIENGESSELLSCHAFT) 10 December 1980 see abstract, claims --</td> <td style="text-align: center; vertical-align: top;">1</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top;">A</td> <td>Chemical Abstracts, volume 96, 1982, Nr. 3, 18 January 1982, (Columbus, Ohio, US), see page 176, abstract 16781y, E. Wuensch et al.: "Studies on enzymic methods for processing hybrid proteins produced by recombinant DNA technology". see abstract --</td> <td style="text-align: center; vertical-align: top;">1</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top;">A</td> <td>Proc. Natl. Acad. Sci. USA, volume 81, pages 4692-4696, August 1984, J. Germino et al.: "Rapid purification of a cloned gene product by genetic fusion and site- -specific proteolysis". see abstract and figure 2 --</td> <td style="text-align: center; vertical-align: top;">1</td> </tr> <tr> <td colspan="2" style="text-align: right; padding-top: 20px;">./.</td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <div style="font-size: x-small; margin-top: 10px;"> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 48%;"> <p>[*] Special categories of cited documents: ¹⁰</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 48%;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"&" document member of the same patent family</p> </div> </div> </div>			Category [*]	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³	A	EP, A, 0 020 290 (SCHERING AKTIENGESSELLSCHAFT) 10 December 1980 see abstract, claims --	1	A	Chemical Abstracts, volume 96, 1982, Nr. 3, 18 January 1982, (Columbus, Ohio, US), see page 176, abstract 16781y, E. Wuensch et al.: "Studies on enzymic methods for processing hybrid proteins produced by recombinant DNA technology". see abstract --	1	A	Proc. Natl. Acad. Sci. USA, volume 81, pages 4692-4696, August 1984, J. Germino et al.: "Rapid purification of a cloned gene product by genetic fusion and site- -specific proteolysis". see abstract and figure 2 --	1	./.		
Category [*]	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³															
A	EP, A, 0 020 290 (SCHERING AKTIENGESSELLSCHAFT) 10 December 1980 see abstract, claims --	1															
A	Chemical Abstracts, volume 96, 1982, Nr. 3, 18 January 1982, (Columbus, Ohio, US), see page 176, abstract 16781y, E. Wuensch et al.: "Studies on enzymic methods for processing hybrid proteins produced by recombinant DNA technology". see abstract --	1															
A	Proc. Natl. Acad. Sci. USA, volume 81, pages 4692-4696, August 1984, J. Germino et al.: "Rapid purification of a cloned gene product by genetic fusion and site- -specific proteolysis". see abstract and figure 2 --	1															
./.																	
IV. CERTIFICATION <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; border-bottom: 1px solid black; font-size: small;">Date of the Actual Completion of the International Search</td> <td style="width: 50%; border-bottom: 1px solid black; font-size: small;">Date of Mailing of this International Search Report</td> </tr> <tr> <td style="border: none; padding-top: 5px;">16 November 1988 (16.11.88)</td> <td style="border: none; padding-top: 5px;">9 December 1988 (09.12.88)</td> </tr> <tr> <td style="width: 50%; border-bottom: 1px solid black; font-size: small;">International Searching Authority</td> <td style="width: 50%; border-bottom: 1px solid black; font-size: small;">Signature of Authorized Officer</td> </tr> <tr> <td style="border: none; padding-top: 5px;">European Patent Office</td> <td style="border: none; padding-top: 5px;"></td> </tr> </table>			Date of the Actual Completion of the International Search	Date of Mailing of this International Search Report	16 November 1988 (16.11.88)	9 December 1988 (09.12.88)	International Searching Authority	Signature of Authorized Officer	European Patent Office								
Date of the Actual Completion of the International Search	Date of Mailing of this International Search Report																
16 November 1988 (16.11.88)	9 December 1988 (09.12.88)																
International Searching Authority	Signature of Authorized Officer																
European Patent Office																	

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)

Category *	Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No
A	EP, A, 0 095 361 (ELI LILLY AND COMPANY) 30 November 1983 see claims 9-11 --	1
A	EP, A, 0 161 937 (CELLTECH LIMITED) 21 November 1985 see claims 1-4 --	1
A	EP, A, 0 157 235 (BAYER AG) 9 October 1985 see figure 1 and claims 6-8 -----	1

ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.


PCT/DE88/00535
SA 24024

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report.
The members are as contained in the European Patent Office EDP file on 17/10/88
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A- 0020290	10-12-80	DE-A- 2922496	04-12-80
		JP-A-56068399	09-06-81
		AT-E- 8411	15-07-84
		US-A- 4543329	24-09-85
		DE-A- 3012170	01-10-81
		JP-A-60256396	18-12-85
		DE-A- 3012169	01-10-81
EP-A- 0095361	30-11-83	GB-A- 2121054	14-12-83
		JP-A-58219199	20-12-83
		AU-A 560965	30-04-87
		CA-A- 1231068	05-01-88
		US-A- 4745069	17-05-88
EP-A- 0161937	21-11-85	GB-A- 2160206	18-12-85
		JP-A-61135591	23-06-86
EP-A- 0157235	09-10-85	DE-A- 3410437	26-09-85
		JP-A-60214897	28-10-85
		CA-A- 1230840	29-12-87

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/DE88/00535

I. KLASSIFIKATION DES ANMELDUNGSGEGENSTANDS (bei mehreren Klassifikationssymbolen sind alle anzugeben) ⁶		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC		
Int. Cl. ⁴ C 12 N 15/00; C 12 P 21/00		
II. RECHERCHIERTE SACHGEBIETE		
Recherchierter Mindestprüfstoff ⁷		
Klassifikationssystem	Klassifikationssymbole	
Int. Cl. ⁴ IPC ⁴	C 12 N; C 12 P	
Recherchierte nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen ⁸		
III. EINSCHLÄGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN⁹		
Art*	Kennzeichnung der Veröffentlichung ¹¹ , soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile ¹²	Betr. Anspruch.Nr. ¹³
A	EP, A 0 020 290 (SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT) 10. Dezember 1980 Siehe Zusammenfassung, Ansprüche --	1
A	Chemical Abstracts, Band 96, 1982, Nr. 3, 18. Januar 1982, (Columbus, Ohio, US), siehe Seite 176, abstract 16781y, E. Wuensch et al.: "Studies on enzymic methods for processing hybrid proteins produced by recombinant DNA technology". Siehe Zusammenfassung --	1
A	Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Band 81, Seiten 4692-4696, August 1984, J. Germino et al.: "Rapid purification of a cloned gene product by genetic fusion and site- -specific proteolysis". Siehe Zusammenfassung und figur 2 --	1
./.		
<p>* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen¹⁰:</p> <p>"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</p> <p>"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)</p> <p>"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</p> <p>"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist</p> <p>"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden</p> <p>"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist</p> <p>"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p>		
IV. BESCHEINIGUNG		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche		Absenddatum des internationalen Recherchenberichts
16. November 1988		09 DEC 1988
Internationale Recherchenbehörde		Unterschrift des bevollmächtigten Bediensteten
Europäisches Patentamt		 P. G. VAN DER PUTTEN

III. EINSCHLÄGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN (Fortsetzung von Blatt 2)		
Art *	Kennzeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	EP, A, 0 095 361 (ELI LILLY AND COMPANY) 30. November 1983 Siehe Ansprüche 9-11 --	1
A	EP, A, 0 161 937 (CELLTECH LIMITED) 21. November 1985 Siehe Ansprüche 1-4 --	1
A	EP, A, 0 157 235 (BAYER AG) 9. Oktober 1985 Siehe Figur 1 und Ansprüche 6-8 --	1

ANHANG ZUM INTERNATIONALEN RECHERCHENBERICHT
 ÜBER DIE INTERNATIONALE PATENTANMELDUNG NR.

PCT/DE88/00535
 SA 24024

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten internationalen Recherchenbericht angeführten Patentedokumente angegeben.

Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am
 Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP-A- 0020290	10-12-80	DE-A- 2922496	04-12-80
		JP-A-56068399	09-06-81
		AT-E- 8411	15-07-84
		US-A- 4543329	24-09-85
		DE-A- 3012170	01-10-81
		JP-A-60256396	18-12-85
		DE-A- 3012169	01-10-81
EP-A- 0095361	30-11-83	GB-A- 2121054	14-12-83
		JP-A-58219199	20-12-83
		AU-A- 560965	30-04-87
		CA-A- 1231068	05-01-88
		US-A- 4745069	17-05-88
EP-A- 0161937	21-11-85	GB-A- 2160206	18-12-85
		JP-A-61135591	23-06-86
EP-A- 0157235	09-10-85	DE-A- 3410437	26-09-85
		JP-A-60214897	28-10-85
		CA-A- 1230840	29-12-87

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)